

1. ФИЗИОЛОГИЯ ГЕНА И СИНТЕЗ МАКРОМОЛЕКУЛ

С.Г.Инге-Вечтомов

ПРИНЦИП ПОЛИВАРИАНТНОСТИ МАТРИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

Кафедра генетики и селекции ДГУ

В в е д е н и е

Воспроизведение специфичности живых систем вообще (наследственность) и существование биологической индивидуальности в частности (изменчивость) основаны на матричном принципе синтеза макромолекул — белков и нуклеиновых кислот. Воспроизведение и действие генов обеспечивают три матричных процесса: репликация (воспроизведение кодирующих полимеров — ДНК, реже РНК), транскрипция (в результате которой генетическая информация переписывается на молекулы РНК и переносится к рибосомам) и трансляция (синтез полипептидных цепей). Биологическое значение матричного принципа позволяет, опираясь на него, искать единый подход к механизмам наследственной и ненаследственной изменчивости.

Такой подход мы попытались осуществить в настоящей статье, которая одновременно посвящена развитию некоторых положений, выдвинутых ранее при обсуждении проблемы неоднозначности действия гена (Инге-Вечтомов, 1969; Инге-Вечтомов и др., 1971).

Три упомянутых матричных процесса обладают чертами сходства, которые, по-видимому, отражают то, что в их основе лежит общий механизм образования Уотсон-Криковских нуклеотидных пар. Каждый матричный процесс осуществляется мультиэнзимным (или мультимерным) комплексом,двигающимся вдоль матрицы. Эти мультиэнзимные комплексы содержат большее или меньшее число компонентов, ассоциированных в единую стабильную структуру.

Хорошо известно, что процесс трансляции обеспечивается рибосомой, которая состоит из рРНК и примерно 80 белков, постоянно ассоциированных с рРНК. Около 10 белков присутствуют в рибосоме лишь временно (Lengyel, 1961, 1969; Wittman, 1970).

Транскрипцию осуществляет также мультиэнзимный комплекс, число белков которого до сих пор не выявлено окончательно, однако очевидно, что ферментная система, называемая ДНК-зависимой РНК-полимеразой, в разных условиях жизни одной и той же клетки, на разных стадиях развития и т.д.

содержит в сумме значительное число субъединиц (около 10) (Horvitz, 1973).

Наконец, и в случае репликации мы также имеем дело со многими белками, которые собираются в комплекс в точке репликации. Несмотря на то, что эта ассоциация временна и мультиэнзимный комплекс репликации, содержащий по предварительным подсчетам около полутора-двух десятков белков, никому еще выделить не удалось, А.Корнберг и Б.Альбертс считают возможным говорить даже о некой временной рибосоме репликации (Kornberg, 1971).

Все три рассматриваемых матричных процесса могут быть неоднозначными. Принято говорить об ошибках матричных процессов. В дальнейшем мы будем избегать этого термина из-за его очевидного антропоморфизма и пользоваться термином "неоднозначность".

Неоднозначность матричных процессов (далее просто неоднозначность) подразумевает, что одному символу кодирующего полимера может соответствовать более одного символа дочернего полимера. Неоднозначность является следствием того, что один и тот же матричный синтез может быть проведен несколькими способами, т.е. существует несколько вариантов читающего устройства — ферментной системы, осуществляющей данный синтез. Неоднозначность, таким образом, рассматривается как следствие поливариантности матричных процессов. В основе поливариантности может лежать существование нескольких ферментов, выполняющих близкие функции, например несколько ДНК-полимераз. Кроме того, поливариантность может быть связана с существованием различных конформаций одного и того же фермента.

Наличие поливариантности ведет к неоднозначности не всегда, а лишь в тех случаях, когда поливариантность синтеза приводит к возникновению гетерогенности синтезируемых макромолекул.

Представление о поливариантности матричных процессов равнозначно констатации их изменчивости. При этом, используя понятие "неоднозначность" вместо понятия "ошибочность", мы хотели бы подчеркнуть существование биологических (генетически регулируемых) механизмов обеспечения неоднозначности матричных процессов. Кратко наша точка зрения может быть сформулирована в виде следующего постулата, который мы назовем принципом поливариантности.

Поливариантность и связанная с ней неоднозначность каждого матричного процесса является следствием и условием существования живых систем. Целью всего дальнейшего изложения является обсуждение того, насколько справедливо и доказуемо это утверждение.

Элементарные проявления поливариантности и неоднозначности

Если исходить из нашего определения поливариантности, то в экспериментальном плане, очевидно, разумнее всего обратиться к поискам примеров генетически детерминированной неоднозначности. При этом элементарные проявления неоднозначности следует рассматривать в соответствии с элементарными единицами осуществления каждого матричного процесса. Так, в репликации и транскрипции мы можем рассматривать поливариантность и неоднозначность в считывании отдельных нуклеотидов, в то время как при трансляции — в считывании как отдельных нуклеотидов, так и тринуклеотидных ко-

донсов. Кроме того, во всех случаях можно ожидать различных вариантов считывания знаков, разделяющих репликоны, скриптоны, гены.

Репликация. Справедливость принципа поливариантности применительно к редупликации не вызывает сомнения. Неоднозначность редупликации ведет к спонтанным мутациям. Изменения структуры ферментов метаболизма ДНК приводят к повышению или понижению спонтанной мутабельности. Таким образом, поливариантность редупликации выражается в создании материала для естественного отбора и является условием эволюционного процесса.

В течение последних лет стало очевидным, что частота спонтанных мутаций поддерживается на оптимальном уровне и составляет, например, для фагов, бактерий и грибов примерно 1% на геном на репликацию. В то же время у дрозофилы и человека частота спонтанных мутаций составляет около 100% на геном на половое поколение (по: Drake, 1969). Этот оптимальный уровень мутабельности представляет собой отражение самой организации аппарата репликации клетки. Изменение компонентов этого аппарата, например мутации в гене 43, контролирующем структуру ДНК-полимеразы фага T4, приводят к повышению или понижению спонтанной мутабельности (Speyer, 1965; Waard de e.a., 1965; Drake, Allen, 1968). Мутации в гене 43 фага T4 приводят также и к изменению индуцированного мутационного процесса (Drake, Grenning, 1970; Schnaar e.a., 1973). Мутаторный эффект гена 43 может заключаться не только во включении в растущую полинуклеотидную цепь некомплементарных нуклеотидов (т.е. выражаться в транзициях и трансверсиях) Hall, Lehman, 1968; Hersfield, Noval, 1973), но и во вставках или выпадениях нуклеотидных пар (Berstain, 1969). Предприняты даже попытки связать мутаторный эффект ДНК-полимеразы с возрастанием ее полимеразной, а антимутаторный — экзонуклеазной активности (Muzychzka e.a., 1972). Подобное объяснение, однако, представляется слишком упрощенным, так как и мутаторная, и антимутаторная активность каждой аллели гена 43 имеет свою особую специфичность по отношению к тем генам, мутации которых исследуются.

Неоднозначность репликации зависит не только от самой ДНК-полимеразы, но и от других компонентов репликативного комплекса. Для того же фага T4 продемонстрирован мутаторный эффект изменений в гене 32 (Bernstein e.a., 1972). Продукт этого гена, так называемый белок Альбертса, стимулирует активность ДНК-полимеразы и принимает участие в рекомбинации (Alberts, 1970; Huberman e.a., 1971).

Мутации в гене, контролирующем лигазу, также приводят к изменению частоты мутирования под действием аналогов оснований (Berstain, Wilson, 1973). Мы не будем стремиться умножать примеры подобного рода и отошлем читателя к материалам симпозиума по генетике мутационного процесса, состоявшегося в 1973 г. (Drake, 1973). Таким образом, не только частота спонтанного мутирования, но и реакция генов на мутагенные воздействия зависят от структуры ферментов, принимающих участие в репликации ДНК.

Возможность неоднозначного функционирования знаков препинания, разделяющих соседние репликоны, показана для многоклеточных эукариота. Об этом говорит различная степень полипloidности разных участков гигантских хромосом двукрылых, а также наблюдаемое на основе автордиографических исследований изменение размера репликона в ходе дифференцировки у многоклеточных (по: Георгиев, 1973).

Транскрипция. Справедливость принципа поливариантности применительно к транскрипции обосновать и проиллюстрировать значительно труднее из-за того, что мы еще слишком мало знаем о деталях этого процесса. Здесь мы только остановимся на некоторых фактах, указывающих на то, что транскрипция может быть неоднозначной.

Об этом прежде всего говорят факты включения в иРНК аналогов оснований, которые при соответствующем выборе модели могут привести к четкому фенотипическому эффекту типа фенотипической супрессии. Впервые такие данные были получены С.Чеймпом и С.Бензером при действии 5-флуор урацила на некоторые мутанты г П фага Т4 (Champe, Benzer, 1962), а также У.Барнеттом и Х.Брокманом при действии 5-флуор урацила и 8-азагуанина на некоторые мутанты *ade 3 Neurospora crassa* (Barnett, Brockman, 1962). В дальнейшем аналогичные данные получены для мутантов по ряду генов бактериофага Т4 (Edlin, 1965; Bould, 1973), а также для мутантов по щелочной фосфатазе *Escherichia coli* (Rosen e.a., 1969). Аналоги с высокой эффективностью включаются в РНК, например, 5-флуор урацил замещает до 83% урацила в РНК *E. coli* (Kaizer, 1970). Подобное эффективное замещение нормальныхномеров РНК аналогом объясняет фенотипический эффект сохраняющийся, например, у полиовируса в течение некоторого времени после отмывки от аналога (Tershak, 1966). Эти данные представляют интерес в связи с тем, что для некоторых мутаторов *E. coli* и *Salmonella typhimurium* показано, что механизм их действия заключается в синтезе необычных оснований, и, таким образом, можно предполагать, что неоднозначность репликации и транскрипции может иметь общие причины.

Примеры неоднозначного считывания знаков пунктуации скриптов можно найти в работах по генетике развития фага λ (Adhya e.a., 1974; по: Ратнер, 1974).

Наконец, самые общие соображения о том, что транскрипцию осуществляют белки, структура которых находится под генным контролем, заставляют нас прийти к выводу о том, что и транскрипции, так же как и репликации, должна быть свойственна неоднозначность. К сожалению, уровень спонтанной неоднозначности транскрипции до настоящего времени никому измерить не удалось. Точно так же, как неизвестно, какие именно компоненты аппарата транскрипции ответственны за ее неоднозначность.

Рассматривая поливариантность транскрипции, следует помнить, что синтез трех типов клеточной РНК (иРНК, тРНК и рРНК) регулируется независимо (Norgis, Koch, 1972) и, следовательно, вклад поливариантности в их образование может быть различным.

Трансляция. Синтез белка — трансляция — единственный матричный процесс, для которого в настоящее время показана поливариантность, как приводящая, так и не приводящая к неоднозначности.

Теория Ф.Крика о неоднозначном соответствии кодонов иРНК и антикодонов тРНК описывает, каким образом один и тот же кодон могут читать разные изоакцепторные тРНК (Crick, 1966), и многочисленные данные по генотипической и фенотипической супрессии показывают, что трансляция может быть неоднозначной (Gorini, 1970).

На наших глазах рушатся представления об исключительной точности трансляции. Р.Доффилд показал, что такие похожие аминокислоты, как изолейцин и валин, замещают друг друга в полипептидных цепях с частотой око-

до 0,0003 (Loftfield, Vanderjagt, 1972). Получены данные о возможности образования *in vitro* таких неспецифических аминоацил-тРНК, как Иле-тРНК^{Ben} и Иле-тРНК^{et}. Образование подобных комплексов стимулирует добавление метанола (Mertes e.a., 1971; Yarus, 1972). То, что подобное неспецифическое ацилирование тРНК находится под генетическим контролем, следует из экспериментов по ацилированию мутантной тРНК^{Tyr} *Escherichia coli* глутаминовой кислотой (Hooper e.a., 1972; Shimura e.a., 1972).

С середины 60-х годов стали появляться данные, указывающие на неоднозначность трансляции на рибосомальном уровне, возникающую под действием ряда аминогликозидных антибиотиков, в частности стрептомицина, у бактерий (Apirion, Schlessinger, 1969; Gorini, 1970). В дальнейшем Б.М.Медников с соавт. удалось показать влияние стрептомицина на точность трансляции у многоклеточного эукариона *Bombux mori* при синтезе серицина (Галимова и др., 1968; Медников и др., 1969). Оказалось, что у эукариот, так же как и у прокариот, *in vitro* целый ряд факторов (повышение концентрации Mg^{2+} , тРНК, этанол, снижение pH, изменение температуры) повышает неоднозначность трансляции на рибосомальном уровне (Grunberg-Manago, London, 1965; Capeschi, 1967; Lamfrom, Grunberg-Manago, 1967; Byfield e.a., 1969).

Наиболее интересные данные о неоднозначности в работе рибосом *E. coli* получены Л.Горини в экспериментах по влиянию стрептомицина на трансляцию и по генетическому контролю точности работы рибосом. Десять лет работы в этой области привели Л.Горини к выводу о том, что неоднозначность трансляции является неотъемлемым свойством рибосомы. Им был обнаружен в рибосоме центр Ram, ответственный за неоднозначность трансляции, и исследован его генетический контроль (Rosset, Gorini, 1969). К настоящему времени стали ясны некоторые закономерности неоднозначности трансляции, определяемые рибосомой. Они суммированы в одной из последних работ Л.Горини следующим образом:

- 1) в присутствии стрептомицина обнаруживаются ошибки считывания только одного основания кодона одновременно;
 - 2) такое основание находится в 5' положении кодона или в его середине;
 - 3) основание У читается как Ц или А;
 - 4) неоднозначность считывания триплетов зависит от природы соседних оснований;
 - 5) стрептомицин усиливает неоднозначность, характерную для кода.
- Никаких данных о том, что стрептомицин сам по себе вызывает дополнительную неоднозначность, пока нет (Gorini, 1974).

Весьма вероятное физическое объяснение механизма, обеспечивающего рибосомальную неоднозначность, предложил недавно В.С.Шварц (Шварц, Лысков, 1974). Основываясь на модели А.Спирина смыкания-размыкания рибосомальных субчастиц (Спирин, 1970), В.С.Шварц показал, что увеличение времени экспонирования кодона должно приводить к уменьшению неоднозначности, а уменьшение времени экспонирования кодона — к увеличению неоднозначности трансляции (Шварц, Лысков, 1976).

Дополнительные данные о характере неоднозначности трансляции могут быть получены на модели, как бы самой природой предназначенной для изучения этого вопроса, — при изучении функционирования кодонов-нонсенсов.

Горини отмечает, что кодоны-нонсенсы, представляющие собой сигналы терминации полипептидов, могут обуславливать неполное прекращение трансляции (Gorini, 1975). Действительно, показано, что нонсенс-кодон УГА у *Salmonella typhimurium* (Roth, 1970), а также нонсенс-кодons УАГ и УАА в структурном гене для щелочной фосфатазы *Escherichia coli* (Rosen e.a., 1969) считаются с низкой частотой как значащие кодоны. В последнем случае удалось измерить ферментативную активность синтезируемой щелочной фосфатазы. Она составляла около 0,1% от активности фермента дикого типа.

При изучении генетического контроля трансляции у дрожжей нами в совместной работе с Н.Н.Хромовым-Борисовым и Л.Н.Мироновой получены данные о неоднозначной трансляции нонсенс-кодонов. Два нонсенс-мутанта по гену *ade₁* были способны при определенном подборе генотипического фона расти на среде без аденина, но при повышенной концентрации ионов Mg^{2+} . Интерпретация этих результатов возможна с учетом расположения мутаций на карте гена (Попова и др., 1968, 1973), которая представлена на рис.1. Труд-

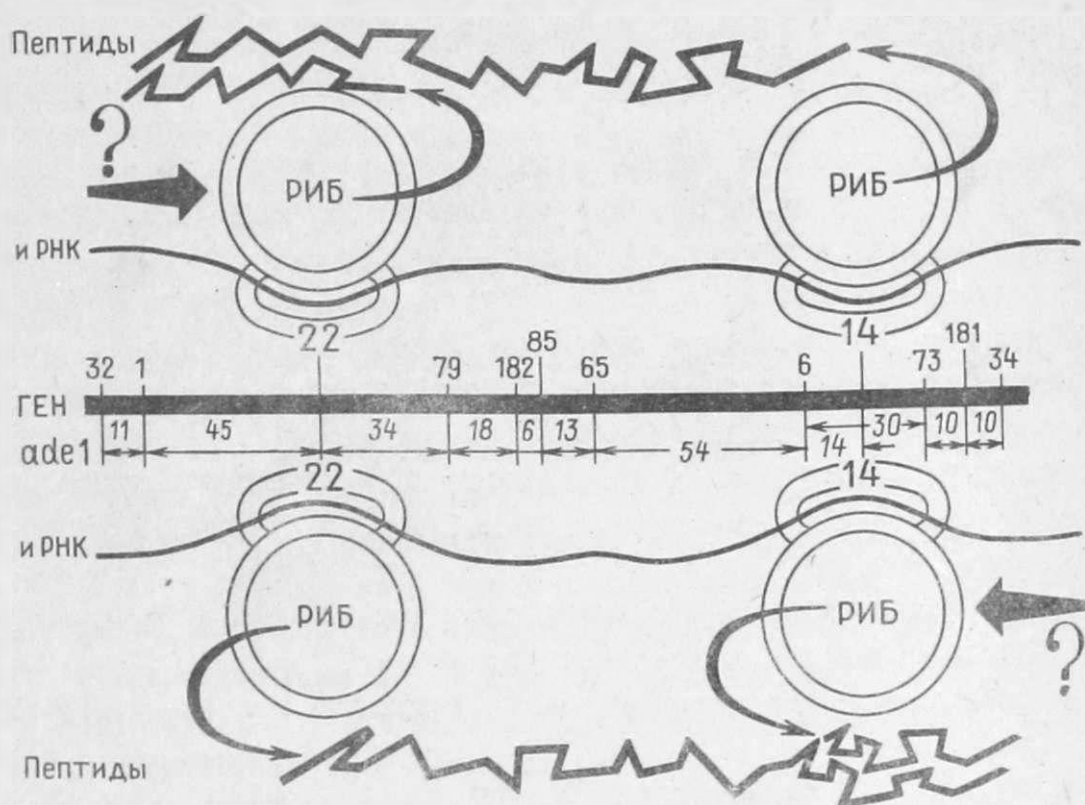


Рис.1. Возможное влияние нонсенс-мутаций 14 и 22 на синтез полипептидных цепей в зависимости от направления трансляции в гене *ade₁* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Горизонтальная линия - карта гена *ade₁*. Цифры над горизонтальной линией - номера мутаций; выделены (над и под линией) - мутации 14 и 22. Цифры под горизонтальной линией - расстояния между мутациями, выраженные в частоте спонтанной митотической рекомбинации на клетку на клеточное деление ($\times 10^{-8}$) (по: Попова и др., 1968, 1973). Горизонтальные стерлки с вопросительными знаками - возможные направления трансляции. Риб - рибосома.

но представить себе, что ионы Mg^{2+} активировали короткий фрагмент полипептидной цепи, образующийся в результате блокирования трансляции.

Мы не знаем направления трансляции в гене *ade₁*. Тем не менее, поскольку исследуемые мутации находились в разных концах гена *ade₁*, то с какого бы конца ни начиналась трансляция, один из мутантов должен образовывать пептид, составляющий менее 1/3 от нормальной длины полипептидной цепи, судя по карте рекомбинации.

Более вероятной является интерпретация, предлагаемая для таких случаев Л.Горини, а именно, что трансляционную "утечку" можно объяснить, лишь допустив, что нонсенс-кодоны действительно читаются с низкой эффективностью некоторыми тРНК, присутствующими в клетке". " В условиях *in vitro* кодон УГА, например, наиболее часто считываемый, может связывать 6 различных аминсацил-тРНК, хотя и с низкой эффективностью" (Gorini, 1975). При этом стимулирующее действие ионов Mg^{2+} мы можем интерпретировать так же, как и стимулирующее действие стрептомицина. В пользу такой интерпретации говорит и факт фенотипической супрессии мутации *lys 2* -A12 у *Saccharomyces cerevisiae*, полученный нами. Восстановление прототрофности по лизину под действием ионов Mg^{2+} в этом случае происходит только при введении в гаплоид мутаций, частично инактивирующих белки, участвующие в нормальной терминеции полипептидов (Миронова и др., 1976), которые, как известно, высокоэффективно конкурируют за нонсенс-кодоны, даже с супрессорными тРНК (Beaudest, Caskey, 1970).

Эксперименты, демонстрирующие возможность неоднозначной трансляции нонсенс-кодонов, доказывают одновременно наличие неоднозначности в считывании знаков, разделяющих соседние гены. Об этой возможности говорят и данные С.Филлипса и др., обнаруживших, что в результате мутационной инактивации одного из белков-терминаторов начинается трансляция (осмысливание) двух нонсенов - УГА и УАА у *Escherichia coli*. Фенотипически это выражается в супрессии соответствующих мутаций (Phillips e.a., 1969). Аналогичны данные по супрессии нонсенов у дрожжей, полученные в нашей лаборатории (Миронова и др., 1976), а также по супрессии нонсенса УГА у *Salmonella typhimurium* (Reeves, Roth, 1971). Известны также примеры осмысления знаков терминеции в ходе нормального развития РНК содержащих бактериофагов. В результате этого процесса появляется четвертый белок в дополнение к трем, кодируемым тремя генами этих бактериофагов.

Сейчас практически отсутствуют данные о том, существует ли единый механизм, обеспечивающий поливариантность в считывании отдельных нуклеотидов и целых кодонов, а также значащих и бессмысленных кодонов.

Существуют, правда, ограниченные пока данные о полигенном контроле неоднозначности трансляции. В экспериментах Г.Стента и др. показано, что характер функционирования нонсенс-супрессорных тРНК у *Escherichia coli* находится под контролем нескольких генов. Генетическая гетерогенность исследованных штаммов проявлялась только в присутствии мутации *Su*⁺, при некоторых факторы оказались локализованными вблизи известных генов, контролирующих компоненты аппарата трансляции (Hill, Stent, 1965; Krieg, Stent, 1968 a, 1968 b).

Другой пример полигенного контроля трансляции нонсенс-кодонов (у дрожжей) получен в нашей лаборатории. Подробное изложение этих экспериментов можно найти в настоящем сборнике (Миронова и др., 1976). Отметим, только, что в данном случае трансляция нонсенов происходила в штаммах, имеющих нарушения комплекса терминеции, но не несущих каких-либо мутаций, механизм действия которых мог бы быть объяснен на основании гипотезы об изменении тРНК.

Имеющиеся в настоящее время данные о неоднозначном опознавании зна-инициации трансляции пока ограничиваются примерами избирательного действия антибиотиков на инициацию трансляции разных генов у РНК-содержащих бактериофагов (Kozak, Nathans, 1972; Okuyama, Tanaka, 1972).

Итак, рассмотрение трех матричных процессов (репликации, транскрипции и трансляции) показывает, что поливариантность, в частности приводящая к неоднозначности, свойственна репликации и трансляции, а по всей видимости, и транскрипции. Если биологическое (эволюционное) значение поливариантности репликации вряд ли требует дополнительного обоснования, то возможная биологическая роль поливариантности транскрипции и трансляции не столь очевидна и требует специального обсуждения.

Возможное адаптивное значение неоднозначности транскрипции и трансляции

Повышение уровня неоднозначности трансляции (и, видимо, транскрипции) должно приводить к увеличению разнообразия полипептидных цепей, синтезируемых практически под контролем всех генов клетки. Это может служить расширению нормы реакции клетки и увеличивать шансы ее неспецифической адаптации в крайних условиях существования за счет синтеза атипичных форм белков, которые могут обеспечить выживание клетки, присутствуя даже в незначительной концентрации.

В данном случае нас интересует именно возможность адаптации к крайним условиям существования, выходящим за пределы физиологического оптимума.

Источником поливариантности может служить накопление так называемых нейтральных мутаций в генах, контролирующих матричные процессы. Будучи нейтральными в оптимальных условиях существования, эти мутации могут проявляться в усилении неоднозначности в крайних условиях существования.

Поливариантность, как адаптивное свойство, необходимо рассматривать не только на уровне одной клетки или организма в ходе индивидуального развития, а и на популяционном уровне. Всякий сдвиг условий в неблагоприятную сторону дифференцирует популяцию по уровням реализуемой поливариантности, по степени неоднозначности матричных процессов. При этом будут гибнуть особи с минимальным выражением поливариантности, так как они наименее способны к неспецифическим адаптивным реакциям, и с максимальным выражением поливариантности, так как они неспособны к осуществлению конкретных биологических функций.

Повышение поливариантности репликации при этом выразится в общем повышении мутабельности, которая будет затрагивать и гены, контролирующие все матричные процессы. При сохранении изменившихся условий стабилизирующий отбор вернет уровень поливариантности к оптимуму, а запас так называемых нейтральных мутаций, потенциально способных усилить поливариантность, явится резервом для неспецифических адаптаций при последующих сдвигах условий. Такие неспецифические адаптации — модификации — способствуют сохранению и воспроизведению части популяции в течение поколений, необходимых для отбора соответствующих мутаций, обеспечивающих более высокую пенетрантность адаптивных признаков. Здесь налицо параллелизм с точкой зрения К. Уоддингтона о так называемой канализации развития (Уоддингтон, 1964).

Адаптивное значение поливариантности приобретает телеономический аспект, если предположить, что поливариантность всех матричных процессов изменяется не независимо, а может представлять собой систему взаимодействующих реакций.

Единство внутренних факторов наследственной и ненаследственной изменчивости

Возвращаясь к тому, что основной чертой сходства рассматриваемых матричных процессов является фиксация уотсон-криковских нуклеотидных пар, вполне допустимо, что и структура белков, обслуживающих эти процессы, должна носить черты сходства. Такое сходство скорее всего обязано филогенетической общности происхождения матричных процессов. Можно ожидать, что (1) существуют белки, принимающие участие одновременно в двух или трех матричных процессах, и (2) существуют разные белки, работающие в разных матричных процессах, но имеющие сходные участки первичной структуры. Такие белки могли возникать за счет дублирования и частичной дивергенции генов, кодировавших некую предковую молекулу, осуществлявшую первичный матричный процесс, носивший черты, общие для репликации, транскрипции и трансляции. Такого рода частичную дивергенцию полипептидных цепи мы видим в эволюции гемоглобинов (Zuckerkandle, 1965).

Примером незначительной пока дивергенции белков, участвующих в транскрипции, является существование двух РНК-полимераз в ядре у дрожжей. Эти ферменты различаются по функции, но сохранили иммунологическое сходство (Hildebrandt e.a., 1973).

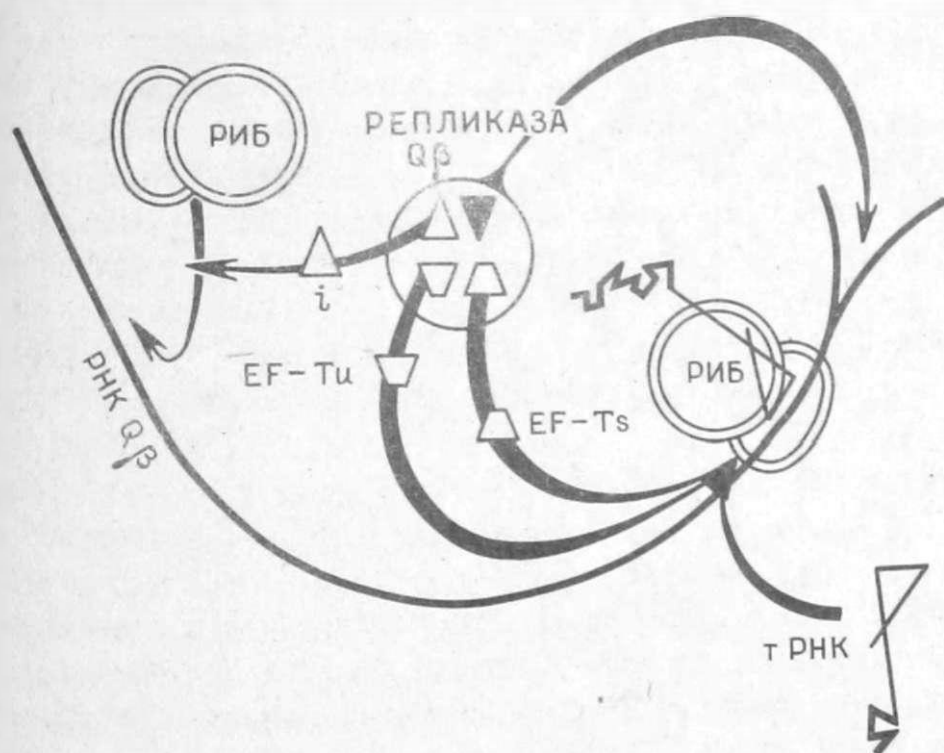


Рис.2. Участие факторов трансляции: *i*, EF-Tu, EF-Ts в репликации РНК бактериофага Qβ (по данным Groner e.a., 1972).

В качестве прямых указаний на справедливость нашей точки зрения следует привести данные о структуре РНК-репликазы бактериофага ϕ_{λ} . Этот фермент состоит из четырех неидентичных субъединиц, из которых лишь одну кодирует РНК ϕ_{λ} . Остальные три субъединицы кодирует ДНК *Escherichia coli*. Эти три субъединицы представляют собой по совместительству: антиинициатор - фактор i , препятствующий началу трансляции; и два фактора элонгации полипептидной цепи - EF-Tu и EF-Ts (рис.2) (Blumenthal e.a., 1972; Groner e.a., 1972).

Показано участие тех же факторов трансляции EF-Tu и EF-Ts в регуляции транскрипции генов, кодирующих рибосомальную РНК (Travers, 1973). Некоторые белки рибосом, входящие в субчастицы 30S и 50S стимулируют начальную скорость транскрипции (Leovitt e.a., 1972) и, по-видимому, принимают участие в репликации F-факторов у *E. coli* (Yomagata, 1972).

В связи с рассматриваемым вопросом весьма красноречивы данные о возможности трансляции денатурированной кольцевой ДНК на рибосомах *E. coli* в присутствии некоторых антибиотиков (McCarthy, Holland, 1965; Bretscher, 1968). При этом рибосомы избирательно присоединяются к ДНК в точках, соответствующих участкам инициации трансляции (Ohler, Nakada, 1970).

Косвенно на возможное сходство белковых комплексов, участвующих в транскрипции и трансляции, указывают данные, полученные в лаборатории Х.Кораны при синтезе *in vitro* РНК по искусственной матрице ДНК. При этом оказалось, что транскрипция цепочки ДНК, дающей на выходе повторяющийся нонсенс-кодон, прекращается через 15 мин, в то время как синтез РНК, содержащей какой-либо повторяющийся значащий кодон, продолжался линейно по меньшей мере 90 мин (Kossel e.a., 1967; Morgan, 1970). К сожалению, эти работы не получили дальнейшего развития.

Итак, предположение о существовании общих компонентов в виде полипептидных цепей или их частей в комплексах, ответственных за репликацию, транскрипцию и трансляцию, позволяет искать общность в действии внешних агентов, усиливающих их неоднозначность. Все сказанное позволяет предположить, что некоторые внешние агенты или мутации, вызывающие изменения одного матричного процесса, должны одновременно вызывать изменения и других матричных процессов.

Данные, которые могут быть истолкованы в пользу нашей точки зрения, существуют. Это - указания на связь изменений трансляции с повышением мутационности у *E. coli* (Bridges e.a., 1970; Kada, 1970) или изменением устойчивости к ядам репаративной системы (Delvaux, Devoret, 1969). Напомним также данные Р.фон Борстела об антимулаторном эффекте суперсупрессоров (мутаций в генах, контролирующих тРНК) у дрожжей (Borstel von e.a., 1973).

С этой точки зрения можно рассматривать и данные об антимулаторной активности транскрипционного яда - актиномицина Д у *E. coli* (Puglisi, 1968) и мутагенный эффект усиленной транскрипции в гистидиновом опероне (у конститутивного мутанта) *Salmonella typhimurium* (Savic, Kanazir, 1972). Эту связь в отношении этих данных, однако, не должен быть чрезмерным, так как они допускают и иные толкования, а соответствующие эксперименты отнюдь не предусматривали доказательства рассматриваемой гипотезы.

Говоря о единстве факторов и механизмов наследственной и ненаследственной изменчивости, следует также иметь в виду, что некоторые внешние

лучи, например УФ-лучи, могут сходным образом действовать на ДНК и РНК. В обоих случаях происходит димеризация и гидратация пиримидинов (в первую очередь соответственно тимина и урацила). Димеры урацила, возникающие при этом в иРНК, могут читаться как ГУ, а гидрат урацила — как Ц (Ottensmeyer, Whytmore, 1968 a). Вследствие этого УФ-облучение бесклеточных систем белкового синтеза, содержащих поли У, приводит к включению в полипептид серина наряду с фенилаланином (Grossman, 1962). УФ-облучение приводит к фенотипической супрессии amber-мутантов бактериофага T4 (Ottensmeyer, Whytmore, 1968 b).

Итак, рассмотрение всех матричных процессов в клетке как единой системы приводит нас к предположению о неслучайной связи между наследственностью и ненаследственной изменчивостью.

Надежность и поливариантность

Рассматривая поливариантность матричных процессов и в частности трансляции, нельзя обойти тот факт, что некоторые компоненты трансляции (тРНК, рРНК) закодированы во многих генах. Этот факт обычно используют в качестве примера надежности обеспечения функции, имея в виду, что в случае мутирования одного из многих генов, кодирующих, например рРНК, генные копии, оставшиеся неизмененными, будут обеспечивать нормальное функционирование аппарата белкового синтеза.

Более логичной нам представляется несколько иная точка зрения, а именно: множественность генных копий — способ обеспечения поливариантности аппарата трансляции, механизм поддержания нужного уровня неоднозначности белкового синтеза. Очевидно, что множественные генные копии так же подвержены мутационному процессу, как и единичные. Множественность нужна только для сохранения измененных генных копий. Гораздо надежнее, если под надежностью понимать однозначность, иметь всего один ген для каждой молекулы рРНК. В этом случае каждое мутационное отклонение от "стандарта" элиминировалось бы в ходе естественного отбора. Таким образом, генное дублирование с неизбежностью должно создавать неоднозначность и именно этим способом, как нам представляется, обеспечивать надежность (лабильность) аппарата белкового синтеза.

Заключение

Следует отметить, что наиболее существенной и наиболее труднодоказуемой частью рассмотренной здесь концепции является адаптивная ценность поливариантности и связанной с ней неоднозначности матричных процессов. Разработка этого вопроса требует специальной постановки популяционных экспериментов. Если и существуют данные о селективной ценности штаммов *Escherichia coli* с повышенной мутабельностью, то никаких данных о преимуществе того или иного уровня неоднозначности трансляции и тем более транскрипции в настоящее время нет. Эксперименты в этой области пока не проводились. Единственный аргумент, который можно привести в пользу адаптивно-

го значения неоднозначности трансляции и транскрипции, - это существование фенотипической супрессии. Подбор условий, в которых возможна фенотипическая супрессия, и представляет собой моделирование ситуации, в которой неоднозначность может быть адаптивной.

Наконец, рассмотрение поливариантности требует обсуждения вопроса о том, в равной ли степени она касается всех компонентов генома или существуют отдельные гены (скриптоны, репликоны) или их части, которые в большей степени подвержены влиянию поливариантности. Это - проблема канализации поливариантности и неоднозначности. Она связана с вопросом о возможной роли поливариантности в индивидуальном развитии. Ни тот, ни другой вопрос мы здесь не затрагивали, поскольку они требуют самостоятельного обсуждения.

Автор весьма признателен Т.Р.Сойдла, Н.Н.Хромову-Борисову, В.А.Ратнеру, С.В.Шестакову и В.И.Корогодину за обсуждение и критику настоящей работы.

S u m m a r y

A feature which is common for all template processes in the cell is their ambiguity. We formulate some general "ambiguity principle" (principle of polivariantnosti - in Russian):

Ambiguity of every template process is result of and prerequisite for existence of living systems.

Elementary expression of ambiguity is in accordance with elementary units of the corresponding process: in replication and transcription it is reading of single nucleotides, meanwhile in translation - both in reading of single nucleotides and trinucleotide codones. Besides that in all instances one may look for ambiguity in reading of single nucleotides, meanwhile in translation - both in reading of single nucleotides and trinucleotides codones. Besides that one may look for ambiguity in reading of signals which separate replicons, scriptons and genes.

Replication ambiguity is a source of spontaneous mutations and of material for natural selection and evolutionary process. Some general considerations and the facts concerning the possibility of reading through the termination signals in bacteriophages permit one to conclude that transcription is also ambiguous.

Translational ambiguity expresses itself with frequency which is determined genetically and depends on environment.

The elevation of ambiguity level in translation (and possibly in transcription) should cause variation of polipeptides being synthesised under the control of all genes of the cell. This may serve for widening of norm of reaction of cell and consequently help latter to take chances for nonspecific adaptation in extraordinary environment.

Accumulation of mutations in genes controlling template processes may serve as a source of ambiguity. Sometimes being neutral in optimal environment these mutations may express themselves in amplification of ambiguity in extraordinary environment. It is possible to study the genetic determination of ambiguity level in nonsense translation in different conditions. In this connection experiments of S. Phillips and others with *E. coli* and our experiments with yeast are being discussed.

It is possible to assume that all template processes and all corresponding multienzyme complexes originated from the same common predecessor and so they are phylogenetically relative. From this point one may suggest that some common proteins or peptides take part in different template processes. The structure of replicase of ϕ bacteriophage serves as an argument for such possibility.

If some proteins are involved in different template processes than change in precision of one template process may lead to change in precision of another.

У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

- Г а л и м о в а Л.М., М е д н и к о в Б.М., Н о с к о в В.А. Модификация серицинов тутового шелкопряда, обусловленная действием стрептомицина. - "Биохимия", 1968, т.33, с.999-1003.
- Г е о р г и е в Г.П. 38-й Колд Спринг Харбор Симпозиум по количественной биологии, посвященный организации генома у эукариотов. Молек. биологии, 1973, в.6, с.916-924.
- И н г е - В е ч т о м о в С.Г. Точность реализации генетической информации. - "Вестн.АН СССР", 1969, № 8, с.25-30.
- И н г е - В е ч т о м о в С.Г., К о ж и н С.А., С и м а р о в Б.В. и др. Неоднозначность действия гена. - В кн.: Исслед.по генетике, № 4. Л., 1971, с.13-36.
- М е д н и к о в Б.М., Г а л и м о в а Л.М., К о р ж е н к о В.П. и др. Изменения в аминокислотном составе серицина тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) под действием стрептомицина. - "Докл.АН СССР", 1969, т.188, с.1176-1178.
- М и р о н о в а Л.Н., И н г е - В е ч т о м о в С.Г., Л ы з л о - в а Л.В. и др. Генетический контроль трансляции терминирующих кодонов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. - В кн.: Исслед. по генетике, № 7. Л., 1976, с.45-58.
- П о п о в а И.А., И н г е - В е ч т о м о в С.Г., Р а й п у л и с Е.П. Использование спонтанной митотической рекомбинации для анализа тонкой структуры локуса ad_1 у дрожжей *S. cerevisiae*. - "Генетика", 1968, № 11, с.116-122.
- П о п о в а И.А., И н г е - В е ч т о м о в С.Г., Г у к о в с к и й Д.И. и др. Тонкая структура локуса ade_1 у дрожжей *S. cerevisiae*. - "Генетика", 1973, № 7, с.101-109.
- Р а т н е р В.А. Генетическая система, контролирующая онтогенез у фага λ . - "Успехи совр.биолог.", 1974, т.77, с.3-17.
- С п и р и н С.А. Модель функционирующей рибосомы - смыкание и размыкание рибосомных субчастиц. - "Изв.АН СССР", 1970, № 2, с.169-182.
- Ш в а р ц В.С., Л ы с и к о в В.Н. Физические механизмы "рибосомально-го сита". - "Докл. АН СССР", 1974, т.217, с.1446-1448.
- Ш в а р ц В.С., Л ы с и к о в В.Н. Ошибки кодирования. Возможные механизмы, биологическая роль и прикладное значение. - В кн.: Исслед. по генетике, № 7. Л., 1976, с.34-44.
- У о д д и н г т о н К. Морфогенез и генетика. М., 1964. 233 с.

- A d h y a S., G o t t e s m a n M., C r o m b r u g g h e B. Release of polarity in E.coli by gene N of phage : termination and anti-termination of transcription. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1974, vol.71, p.2534-2538.
- A l b e r t s B.M. Function of gene 32-protein, a new protein essential for the genetic recombination and replication of T4 bacteriophage DNA. - "Federat. Proc.", 1970, vol.29, p.1154-1163.
- A p i r i o n D., S c h l e s s i n g e r D. The effect of ribosome alterations on ribosome function, and on expression of ribosome and vonribosome mutations. - In: Mutation as Cellular Process. ed. Wolstenholme G.E. and O'Connor M. London, 1969, p.155-167.
- B a r n e t t W.E., B r o c k m a n H.E. Induced phenotypic reversion by 8-azaguanine and 5-fluorouracil. - "Biophys. Res. Commun.", 1962, vol.7, p.199-201.
- B e a u d e t A.L., C a s k e y T. Release factor translation of RNA phage terminator codons. - "Nature", 1970, vol.227, p.38.
- B e r n s t e i n C., B e r n s t e i n H., M u f t i S. e.a. Stimulation of mutation in phage T4 by lesions in gene 32 and by thymidine imbalance. - "Mut. Res.", 1972, vol.16, p.113-119.
- B e r n s t e i n C., W i l s o n L.B. The effect of a temperature-sensitive ligase on base analogue mutagenesis in bacteriophage T4. - "Abstr. Genetics", 1973, vol.74, p.22.
- B l u m e n t h a l T., L a n d e r s T.A., W e b e r K. Bacteriophage Q replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", vol.69, p.1313-1317.
- B o r s t e l R.C. von, Q u a h S.-K., S t e i n b e r g C.M. e.a. Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. - "Genetics", 1973, vol.73, suppl., p.141-151.
- B o u l d C. Phenotypic reversion by 5-fluorouracil of amber mutations in bacteriophage T4: characterization of rescued functions. - "Molec. Gener. Genet.", 1973, vol.121, p.247-258.
- B r e t s c h e r M.S. Direct translation of a circular messenger DNA. - "Nature", 1968, vol.220, p.1088-1091.
- B r i d g e s B.A., D e n n i s R.E., M u n s o n R.J. Mutagenesis in E.coli. V Attempted interconversion of ochre and amber suppressors and mutational instability due to a ochre suppressor. - "Molec. Gener. Genet.", 1970, vol.107, p.351-360.
- B y f i e l d J.E., L e e J.C., B e n n e t t L.R. Thermal instability of tetrahymena ribosomes: effects on protein synthesis. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1969, vol.37, p.806-812.
- C a p e c c h i M. Polarity in vitro. - "J. Molec. Biol.", 1967, vol.30, p.213-215.
- C h a m p e S., B e n z e r S. Reversal of mutant phenotypes by 5-fluorouracil. An approach to nucleotide sequences in mRNA. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1962, vol.48, p.532-546.
- C r i c k F.H.C. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. - "J. Molec. Biol.", 1966, vol.19, p.548-555.
- D e l v a u x A.M., D e v o r e t R. The occurrence of suppressors in coffeineresistant mutants from E.coli K12. - "Mut. Res.", 1969, vol.7, p.273-285.
- D r a k e J.W. Comparative rates of spontaneous mutation. - "Nature", 1969, vol.221, p.1132.

- Drake J.W. (ed.). The genetic control of mutation. - "Genetics", 1973, vol.73, supplement.
- Drake J.W., Allen E.F. Antimutagenic DNA polymerase of bacteriophage T4. - "Cold Spring Harb. Symp. in Quant. Biol.", 1968, vol.33, p.339-344.
- Drake J.W., Greening E.O. Suppression of chemical mutagenesis in bacteriophage T4 by genetically modified DNA polymerases. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1970, vol.66, p.823-829.
- Edlin G. Gene regulation during bacteriophage T4 development. 1. Phenotypic reversion of T4 amber mutants by 5EU. - "J. Molec. Biol.", 1965, vol.12, p.363-374.
- Gorini L. Informational suppression. - "Ann. Rev. Genetics", 1970, vol.4, p.107-134.
- Gorini L. Streptomycin and misreading of the genetic code. - In: "Ribosomes", ed M.Namuka, A. Tissieres, P.Lengyel. - Cold Spring Harbor Lab., 1974, p. 791-805.
- Kroner J., Scheps R., Kamen R. e.a. Host subunit of Q β replicase is translation factor i. - "Nature New Biol.", 1972, vol.239, p.19-20.
- Grossman L. The effect of UV-irradiation of poly in cell-free protein synthesis in E.coli. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1962, vol.48, p.1609-1614.
- Grunberg - Manago M., Dondon J. Influence of pH and sRNA concentration on coding ambiguities. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1965, vol.18, p.517-522.
- Hall Z.W., Lehman I.R. An in vitro transversion by a mutationally altered T4-induced DNA polymerase. - "J. Molec. Biol.", 1968, vol.36, p.321-333.
- Hershfild M.S., Nossal N.G. In vitro characterization of a mutator T4 DNA polymerase. - "Genetics", 1973, vol.73, suppl., p.131-136.
- Hildebrandt A., Sebastian J., Halvorson H.O. Yeast nuclear RNA polymerases I and II are immunologically related. - "Nature New Biol.", 1973, vol.246, p.73-74.
- Hill R., Stent G.S. Genetic factors of E.coli determining suppression of the amber mutant phenotype of T4 bacteriophage. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1965, vol.18, p.757-762.
- Hooper M.L., Russell R.L., Smith J.D. Miscoding in mutant tyrosine transfer RNAs. - "FEBS Letters", 1972, vol.22, p.149-155.
- Korvitz H.R. Polypeptide bound to the host RNA polymerase is specified by T4 control gene 33. - "Nature New Biol.", 1973, vol.244, p.137-140.
- Huberman J.A., Kornberg A., Alberts B.M. Stimulation of T4 bacteriophage DNA polymerase by the protein product of T4 gene 32. - "J. Molec. Biol.", 1971, vol.62, p.39-52.
- ada T. Studies on the mutability of E.coli K12. I Suppression and high spontaneous mutation in a threonine auxotroph. - "Mut. Res.", 1970, vol.10, p.91-102.
- aiser I. Isolation of 5FU-containing 5S RNA from E.coli. - "Biochemistry", 1970, vol.9, p.569-572.
- rieg R.H., Stent G.S. Bacterial genetic factors controlling

- the suppression of the phage amber mutations. I Suppression patterns of collection of E.coli strains. - "Molec. Gener. Genet.", 1968a, vol.103, p.274-293.
- K r i e g R.H., S t e n t G.S. Bacterial genetic factors controlling the suppression of the phage amber mutations. II Suppression patterns among the segregants of bacterial crosses. - "Molec. Gener. Genet.", 1968b, vol.103, p.294-304.
- K o r n b e r g A. The second Feodor Lynen lecture: enzymes, DNA and membranes. - In: Nucleic acids - protein interaction. Proc. Miami Winter Sympos. eds: Ribbons D.W., Woessner J.F. and Schultz J. North Holland publ. comp., Amsterdam - London, 1971, p.3-24.
- K o z a k M., N a t h a n s D. Differential inhibition of coliphage MS2 protein synthesis by ribosome-directed antibiotics. - "J. Molec. Biol.", 1972, vol.70, p.41-55.
- K o s s e l H., M o r g a n A.R., K h o r a n a H.G. Studies on polynucleotides. LXXIII. Synthesis in vitro of polypeptides containing repeating tetrapeptide sequences dependent upon DNA-like polymers containing repeating tetranucleotide sequences: direction of reading of messenger RNA. - "J. Molec. Biol.", 1967, vol.26, p.449-475.
- L a m f r o m H., G r u n b e r g - M a n a g o M. Ambiguities of translational of poly U in the rabbit reticulocyte system. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1967, vol.27, p.1-6.
- L e n g y e l P., S o l l D. Mechanism of protein biosynthesis. - "Bacter. Rev.", 1969, vol.33, p.264-301.
- L e o v i t t J.C., M o l d a v e K., N a k a d a D. Stimulation of vitro RNA synthesis by ribosomes and ribosomal proteins. - "J. Molec. Biol.", 1972, vol.70, p.15-40.
- L o f t f i e l d R.B., V a n d e r j a g t D. The frequency of errors in protein biosynthesis. - "Biochem. J.", 1972, vol.128, p.1353-1356.
- M c C a r t h y B.J., H o l l a n d J.J. Denatured DNA as a direct template for in vitro protein synthesis. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1965, vol.54, p.880-887.
- M e r t e s M., P e t e r s M.A., M a h o v e y W. e.a. Isolencylation of transfer RNA^{Met}_f (E.coli) by ispleucyl-tRNA synthetases from E.coli. - "J. Molec. Biol.", 1971, vol.71, p.671-685.
- M o r g a n A.R. Studies on polynucleotides. XC IV. Transcription of DNA's with repeating nucleotide sequences. - "J. Molec. Biol.", 1970, vol.52, p.441-466.
- M u z y c z k a N., P a l a u d R.L., B e s s m a n M.J. Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. - "J. Biol. Chem.", 1972, vol.247, p.7110-7122.
- N o r r i s T.E., K o c h A.L. Effect of growth rate on the relative rates of synthesis of messenger ribosomal and transfer RNA in E.coli. - "J. Molec. Biol.", 1972, vol.64, p.633-650.
- O h l e r G., N a k a d a D. Selective binding of ribosomes to initiation sites on single-stranded DNA from bacterial viruses. - "Nature", 1970, vol.22, N 8, p.239-242.
- O k u y a m a A., T a n a k a N. Differential effects of amino glycosides on costron specific initiation of protein synthesis. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1972, vol.49, p.951-957.
- O t t e n s m e y e r F.P., W h i t m o r e G.F. Coding properties of UV-photoproducts of uracil. I. Binding studies and polypeptide synthesis.

sis. - "J.Molec. Biol.", 1968a, vol.38, p.1-16.

Ottensmeyer F.P., Whitmore G.F. Coding properties of UV-photoproducts of uracil. II. Phenotypic reversion of amber mutation: implication of the uracil hydrate. - "J. Molec. Biol.", 1968b, vol.38, p.17-24.

Phillips S., Schlessinger D., Apirion D. Temperature dependent suppression of UGA and UAA codones in a temperature sensitive mutant of E.coli. - "Cold Spring Harb. Symp. on Quant.Biol.", 1969, vol.34, p.499-503.

Puglisi P.P. Antimutagenic activity of actinomycin D and basic fuchsin in *S.cerevisiae*. - "Molec. Gener. Genet.", 1968, vol.103, p.248-252.

Reeves R.H., Roth J.R. A recessive UGA suppressor. - "J. Molec. Biol.", 1971, vol.56, p.523-533.

Rosen B., Rothman F., Weigert M.G. Miscoding caused by 5FU. - "J. Molec. Biol.", 1969, vol.44, p.363-375.

Rosset R., Gorini L. A ribosomal ambiguity mutation. - "J. Molec. Biol.", 1969, vol.39, p.95-112.

Roth J.R. UGA nonsense mutations in *S.thymurium*. - "J. Bacteriol.", 1970, vol.102, p.467.

Schnaar R.L., Muzyczka N., Bessman M.J. Utilization of aminopurine deoxynucleoside triphosphate by mutator, antimutator and wildtype DNA polymerase of bacteriophage T4. - "Genetics", 1973, vol.73, suppl., p.137-140.

Shimura Y., Aono H., Ozeki H. e.a. Mutant tyrosine tRNA of altered amino acid specificity. - "FEBS letters", 1972, vol.22, p.144-148.

Savic D.J., Kanazir D.T. The effect of histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *S.thymurium*. - "Molec. Gener. Genet.", 1972, vol.118, p.45-50.

Speyer J.F. Mutagenic DNA polymerase. - "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1965, vol.21, p.6-8.

Travers A. Control of ribosomal RNA synthesis in vitro. - "Nature", 1973, vol.244, p.15-18.

Tershak D.R. Effect of 5FU on polyovirus-induced RNA polymerase. - "J. Molec. Biol.", 1966, vol.21, p.43-50.

Ward A.de, Paul A.V., Lehman I.R. The structural gene for DNA-polymerase in bacteriophages T4 and T5. - "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1965, vol.54, p.1241-1249.

Wittman H.G. A comparison of ribosomes from prokaryotes and eukaryotes. - In: Organisation and control in prokaryotic and eukaryotic cells. The Soc. Gener. Microbiol. Symp.20, eds: Charles H.P. and Knight B.C. J.G., 1970, p.55-76.

Yarus M. Solvent and specificity. Binding and isoleucylation of phenylalanine transfer RNA (E.coli) by isoleucyl tRNA synthetase from E.coli. - "Biochem.", 1972, vol.11, p.2352-2361.

Yomagata H. Replication of ϕ factors in E.coli - possible role of ribosomal proteins in episomal DNA replication. - "Biol.Sci.", 1972, vol.24, p.113-116.

Zuckerkanale E. The evolution of hemoglobin. - "Sci.Amer.", 1965, vol.212, p.110-118.